

UNIVERSITE DE GENEVE
Section de médecine dentaire

FACULTE DE MEDECINE
Professeur G. CIMASONI

FACULTE DES SCIENCES
Professeur A. LINDER

STABILITE DES LYSOSOMES GINGIVAUX ET VARIATIONS HORMONALES CHEZ LA FEMME

THESE

présentée à la Faculté de médecine de l'Université de Genève
pour obtenir le grade de docteur en médecine dentaire

par

François JACCARD

de

Genève

Thèse No 340

GENEVE
Editions Médecine et Hygiène
1978



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41545917_0036

UNIVERSITE DE GENEVE
Section de médecine dentaire

FACULTE DE MEDECINE
Professeur G. CIMASONI

FACULTE DES SCIENCES
Professeur A. LINDER

STABILITE DES LYSOSOMES GINGIVAUX ET VARIATIONS HORMONALES CHEZ LA FEMME

THESE

présentée à la Faculté de médecine de l'Université de Genève
pour obtenir le grade de docteur en médecine dentaire

par

François JACCARD

de

Genève

Thèse No 340

GENEVE
Editions Médecine et Hygiène
1978

La Faculté de médecine, sur le préavis du professeur G. Cimasoni, autorise l'impression de la présente thèse, sans prétendre par là émettre d'opinion sur les propositions qui y sont énoncées.

Genève, le 27 janvier 1978

Le vice-doyen :
André Cruchaud

Thèse No 340



Pour l'élaboration de ce travail, nous avons bénéficié de conseils précieux ainsi que de la collaboration bienveillante de plusieurs personnes auxquelles nous voulons exprimer ici notre plus vive reconnaissance.

Nous tenons à remercier tout particulièrement :

- Le professeur G. Cimasoni qui a dirigé ce travail avec intérêt et qui nous a aidé par ses conseils judicieux.
- Le professeur A. Linder, qui, avec amabilité et une grande compétence, a apporté son précieux concours à la réalisation de la partie statistique et à la présentation des résultats.
- Les volontaires qui se sont patiemment prêtées aux expériences.
- Madame I. Condacci et Mademoiselle E. Andersen qui ont effectué avec minutie les analyses cellulaires et enzymatiques.
- Madame M. Rénier qui a dactylographié le texte sous sa forme définitive.
- Monsieur F. Blanc, pour son aide dans la construction des appareillages.
- Monsieur R. Pasquier, pour la mise au net des graphiques.

Le présent travail a bénéficié de l'aide financière du Fonds National de la recherche scientifique (No 3.604.0-75).

A MES PARENTS

A MES PROCHES

1. Introduction =====

Le problème des altérations gingivales chez la femme, par exemple au moment de la grossesse, n'est que partiellement compris (28). On connaît le rôle capital de la plaque bactérienne dans l'étiologie de la gingivite de grossesse (42,43,56), mais on sait que le terrain gingival est particulièrement vulnérable envers l'agression bactérienne, lorsqu'il est sous l'influence des hormones sexuelles femelles (28,43).

Synthétisées à partir du cholestérol dans les ovaires et les cortico-surrénales, ces hormones se subdivisent en deux grandes catégories : les hormones oestrogènes et les hormones progestagènes (33). Les hormones oestrogènes exercent leur action surtout au début du cycle menstruel, pendant sa phase prolifératrice ; elles stimulent la prolifération de l'endomètre utérin. Les hormones progestagènes exercent leur action dès l'ovulation et assurent la nidation de l'ovule s'il a été fécondé (33). Des dérivés synthétiques de ces hormones, comme par exemple la 17 α acétoxyprogestérone, la 19 nortestosterone et l'ethinyloestradiol, sont utilisés en associations comme contraceptifs ; ils induisent une situation hormonale chez la femme qui simule l'état de grossesse (19,32).

De nombreux travaux ont démontré que les hormones sexuelles femelles et leurs dérivés synthétiques peuvent aggraver un processus inflammatoire par différents mécanismes. Tout d'abord on sait que les hormones sexuelles provoquent une augmentation du nombre de leucocytes polymorphonucléaires circulants. Les hormones oestrogènes, en particulier, activeraient le relâchement de ces cellules à partir de la moelle osseuse (8). Il est connu également que ces hormones causent une augmentation de la perméabilité capillaire (26) surtout celle des veinules (39) : on sait par exemple que la progestérone agit sur un carbohydrate de la paroi vasculaire et de la substance fondamentale (46). Une telle augmentation de la perméabilité ainsi qu'une prolifération des capillaires a également été démontrée au niveau gingival par Lindhe et ses collaborateurs (38,39,40,41). Ces auteurs ont également constaté que les hormones sexuelles femelles causent une augmentation de la quantité de fluide gingival aussi bien chez l'animal dans des conditions expérimentales (34,35) que chez la femme prenant la pilule (36,37). Enfin plusieurs travaux ont montré que les hormones stéroïdes sexuelles peuvent provoquer une labilisation des membranes lysosomiales et augmenter par conséquence la libération du contenu enzymatique dans le milieu extracellulaire. Ainsi, les recherches histochimiques de Nozawa (47) ont démontré que l'administration d'hormones oestrogènes à des rats ovariectomisés provoquait une libération d'enzymes lysosomiales des cellules de l'épithélium vaginal. Ces travaux ont confirmé ceux de Szego (58) qui avaient

abouti aux mêmes constatations au niveau des glandes préputiennes de rats ovariectomisés. Plus récemment, Persellin (53) a démontré in vitro que la progestérone provoquait une labilisation des membranes lysosomiales des leucocytes polymorphonucléaires (PMN) humains, avec relâchement de β -glucuronidase. D'autres chercheurs ont constaté indirectement cette fragilisation lysosomiale : on peut mentionner les travaux de Briggs (11) qui a trouvé une augmentation de la concentration de β -glucuronidase dans le serum de femmes prenant des contraceptifs hormonaux et ceux de Cochrane (15) qui a décelé, toujours chez des femmes prenant la pilule, une augmentation de phosphatase alcaline.

Or, si les enzymes lysosomiales ont principalement un rôle protecteur en digérant les déchets du métabolisme cellulaire et en éliminant, par phagocytose, les corps étrangers à l'organisme tels que les bactéries et les complexes antigènes-anticorps (1,16,17), elles peuvent avoir une action nocive sur les tissus lorsqu'elles sont libérées à l'extérieur de la cellule (1,61). En ce qui concerne le milieu gingival, il est probable que ces enzymes lysosomiales, présentes dans les leucocytes polymorphonucléaires et les cellules épithéliales, puissent participer à la destruction tissulaire survenant lors de gingivites ou de parodontites. Les taux d'activité de diverses enzymes lysosomiales ont été déterminés dans le sillon gingivo-dentaire en fonction du degré de l'atteinte parodontale : Ishikawa, Cimasoni et Ahmad-Zadeh (29) ont par exemple montré une corrélation positive entre la concentration de la cathepsine D dans le fluide gingival humain et la profondeur des poches parodontales. En outre, dans les produits de rinçage de la région gingivale marginale, il a été observé que les activités libres (c'est-à-dire extralysosomiales) et les activités totales (lysosomiales et extralysosomiales) de la phosphatase acide, de la cathepsine D et de la β -glucuronidase étaient en corrélation positive avec le degré de l'inflammation gingivale (6,59).

La cathepsine D est une enzyme lysosomiale (7,10,48) qui fait partie du groupe de protéinases acides (25). Elle a la propriété de dégrader des substrats de poids moléculaire élevé en milieu acide (9,31). Son rôle est important car elle peut s'attaquer aux complexes glycoprotéiniques du tissu conjonctif lorsqu'elle est libérée dans le milieu extracellulaire (63).

La protéase neutre ("elastase-like" des anglo-saxons) est une enzyme protéolytique présente dans les leucocytes PMN (18,30). Bien que son activité semble augmenter lorsque la gencive est enflammée (50), son action protéolytique in vivo est difficile à évaluer : en effet, son activité est probablement modulée par des inhibiteurs tels que les α_2 macroglobulines (50,51).

La β -glucuronidase est une hydrolase contenue dans les granules primaires des leucocytes polymorphonucléaires (7). Elle parti-

cipe activement au catabolisme final des mucopolysaccharides lorsqu'ils sont scindés par la hyaluronidase (24).

Le but de la présente étude longitudinale a été de mesurer, pendant des cycles menstruels successifs, les variations de différents paramètres cellulaires et enzymatiques du sillon gingivo-dentaire chez des volontaires en bonne santé parodontale et prenant régulièrement des contraceptifs hormonaux. Dans des produits de rinçage de la région gingivale marginale, le nombre de leucocytes PMN et de cellules épithéliales desquamées a été mesuré, ainsi que les concentrations de cathepsine D, de protéase neutre et de β -glucuronidase. La mesure des activités extracellulaire et intracellulaire de ces enzymes lysosomiales aux différentes phases des cycles menstruels a ainsi permis de tester l'hypothèse d'une fragilisation des lysosomes, au niveau de la gencive, par l'action des hormones sexuelles femelles.

2. Matériel et méthodes

=====

Cinq volontaires, âgées de 25 à 28 ans, prenant régulièrement des contraceptifs hormonaux, ont participé à cette étude longitudinale. Leur choix a été guidé par leur bonne hygiène bucco-dentaire.

Les analyses cellulaires et enzymatiques ont été effectuées dans les produits de rinçage de la région gingivale marginale supérieure, pendant 12 cycles menstruels chez l'une des volontaires et pendant 4 à 6 cycles chez les autres. Pour chaque cycle, les mesures ont été prises 2 fois durant les menstruations et 2 à 3 fois durant les phases prolifératrices et sécrétrices (périodes intermenstruelles).

2.1. Lavages de la région gingivale marginale

La collection des produits de lavage de la région gingivale marginale a été obtenue avec l'appareil mis au point par Oppenheim (52) et amélioré pour nos besoins par Sudan (57). Voici un rappel de sa construction. Sur un modèle très précis en plâtre de l'arcade supérieure, la région du sillon gingivo-dentaire est recouverte de bourrelets de cire lingualemement et vestibulairement. Une gouttière en résine autopolymérisante est alors construite sur le modèle ainsi préparé. Pour le contour périphérique du vestibule et du post-damming, une résine molle est utilisée, pour permettre une meilleure adaptation de l'appareil et faciliter son insertion en bouche. Le sillon créé dans la gouttière par le bourrelet de cire longeant le sillon gingival est relié à 4 tubes de polyvinyl. Les extrémités de ces tubes s'emboîtent à une pompe péristaltique par l'intermédiaire de deux seringues de 5 ml. Le vide obtenu par le circuit fermé du système pompe-gouttière provoque une adaptation rigoureuse de l'appareil sur le maxillaire et élimine le risque de fuites.

Les lavages ont été effectués en faisant circuler dans ce réseau 5 ml de solution physiologique titrée à 0,25 M de sucrose pendant 15 minutes. Nous avons choisi ce mélange après avoir observé, dans des essais préliminaires, que le NaCl isotonique pur diminuait l'activité de la β -glucuronidase.

Pour l'ensemble des 5 patientes nous avons effectué, en tout, 94 rinçages.

2.2. Comptage des cellules dans les produits de rinçage

Les leucocytes polymorphonucléaires (PMN) et les cellules épithéliales desquamées ont été comptés dans les produits de rinçage en utilisant une modification de la méthode couramment employée pour le comptage de ces cellules dans le sang (44). Pour ce faire, 1 ml de solution de rinçage a été concentrée

10 fois en la centrifugeant pendant 10 minutes à 180 g dans des tubes de microcentrifugation, puis en éliminant 900 µl du surnageant. Les 100 µl résiduels ont été mélangés avec le culot cellulaire, puis 5 µl de ce mélange ont été prélevés à l'aide d'une pipette Saaringa remplie avec une solution de Türk. Une goutte a été prélevée et le comptage effectué sous le microscope en utilisant un hématocytomètre de Neubauer. La concentration initiale des cellules a été calculée en multipliant les résultats par un facteur de 5000. Ces comptages ont été effectués, en tout, dans 92 produits de rinçage.

Afin de vérifier la précision de la méthode, nous avons procédé à 10 comptages successifs de 10 échantillons provenant d'une même solution de rinçage. Le coefficient de variabilité (*) a été de 3,7 % pour le comptage des leucocytes PMN.

2.3. Analyses enzymatiques

2.3.1. Détermination de la cathepsine D

Cette protéase acide a été déterminée par une modification de la méthode de Anson (2) basée sur l'hydrolyse de l'hémoglobine par l'enzyme. Cette hydrolyse libère des peptides dont la concentration peut être déterminée spectrophotométriquement. Les analyses ont été effectuées dans un tampon Mc Ilvaine, composé d'acide citrique 0,1 M et de Na_2HPO_4 0,2 M, à un pH final de 3,4, optimum pour la cathepsine D (10).

Après avoir mélangé 250 µl de ce tampon à 250 µl d'une solution d'hémoglobine à 6 % (Sigma Type II), 500 µl du produit de rinçage ont été ajoutés. Le mélange ainsi obtenu a été mis à l'incubation au bain-marie pendant 15 heures à 37°C. Après ce laps de temps, la réaction enzymatique a été bloquée par 1 ml d'acide trichloroacétique glacial (TCA) 0,3 M. Rappelons que le TCA provoque la précipitation de l'hémoglobine non dégradée par la cathepsine D.

Parallèlement un essai à blanc a été mené dans les mêmes conditions, en ajoutant 500 µl de produit de rinçage après l'incubation, au moment de l'adjonction du TCA. Les solutions obtenues après la précipitation de l'hémoglobine ont été filtrées et la concentration des peptides libérées par l'hydrolyse de l'hémoglobine déterminée spectrophotométriquement dans le filtrat en utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu et une longueur d'onde de 750 nm. L'activité de la cathepsine D a ainsi pu être calculée par la différence d'absorbance entre l'analyse et le "blanc". Les résultats ont été exprimés en valeur d'absorbance / 500 µl de solution de rinçage. En tout, ont été effectuées 87 analyses de cathepsine D.

$$(*) \text{ Coefficient de variabilité } = \frac{\text{déviati} \text{on standard} \times 100}{\text{moyenne}}$$

2.3.2. Détermination de la protéase neutre

La protéase neutre a été déterminée par une méthode semblable à celle utilisée pour la protéase acide. Pour cette enzyme cependant, l'analyse a été effectuée dans un tampon phosphate afin d'obtenir un pH final du mélange d'incubation de 7.3, ce qui représente le pH optimum de cette enzyme (30). La protéase neutre a été déterminée dans les produits de rinçage de deux patientes seulement, et un total de 30 analyses ont été effectuées.

2.3.3. Détermination de la β -glucuronidase

La β -glucuronidase a été déterminée par la méthode fluorométrique de Mead (45) basée sur l'utilisation d'un substrat donnant un produit hautement fluorescent lorsqu'il est dégradé par l'enzyme. Ce substrat, le 4 méthylumbelliferyl-beta-D glucuronide hydrate (B.D.H. Chemicals Ltd Poole England) a été préparé en dissolvant 1 mM de substance dans un tampon acétate de sodium 0,1 M au pH 5.0. Pour l'analyse, 500 μ l de la solution du substrat ont été ajoutés à 500 μ l du produit de rinçage. Ce mélange a été incubé au bain-marie pendant 45 minutes à 37°C. Puis la réaction enzymatique a été stoppée par adjonction de 2 ml de tampon glycine glaciale ayant un pH de 10,4 et titré à 0.1 M.

Parallèlement une analyse a été menée à blanc dans des conditions semblables. Pour ce faire, seul le substrat a été mis à l'incubation. Après 45 minutes nous lui avons ajouté 500 μ l de produit de rinçage et 2 ml de tampon glycine glaciale.

La fluorescence du méthylumbelliférone libéré par la réaction enzymatique a été lue sur un fluorimètre Aminco 4-7-440 sous une lumière excitante de 364 m μ et avec une lumière d'émission à 448 m μ .

Précédemment une courbe standard avait été établie en fonction de quantités connues et croissantes de méthylumbelliférone. Cette courbe de référence a permis d'exprimer la différence entre l'analyse et "le blanc" en microgrammes de méthylumbelliférone libérés par 500 μ l de solution de rinçage et en 45 minutes.

Un total de 71 analyses de β -glucuronidase ont été effectuées.

2.3.4. Détermination des activités libres, totales et intracellulaires spécifiques des enzymes

Lors de chaque analyse, les concentrations libres, totales et intracellulaires spécifiques ont été déterminées dans les produits de rinçage pour les 3 enzymes étudiées. L'activité libre représente la concentration extralysosomiale de l'enzyme : elle peut être déterminée dans le surnageant obtenu après centri-

fugation du produit de rinçage. Pour mesurer l'activité totale (c'est-à-dire l'activité extralysosomiale + intralysosomiale) il a fallu, au préalable rompre les organelles intracytoplasmiques. Pour cela, un détergent non ionique, le Triton X-100 à 0,1 % (60) a été ajouté au produit de rinçage pendant 3 h à 4°C. Quant à l'activité intracellulaire spécifique, elle a été calculée en divisant la différence entre les activités totale et libre des enzymes par le nombre de leucocytes PMN comptés dans le même volume de produit de rinçage (1 ml).

3. Résultats

=====

3.1. Analyse statistique

Une analyse statistique des résultats a été effectuée pour chaque paramètre. Cette analyse poursuivait un double but : il s'agissait tout d'abord de réunir les données de chaque patiente en faisant abstraction du fait que les paramètres montraient des différences individuelles importantes. Deuxièmement, il a fallu calculer si les valeurs obtenues lors des périodes intermenstruelles s'écartaient de façon significative de celles obtenues lors des menstruations. De plus, chez la patiente que nous avons suivie pendant 12 cycles menstruels successifs, nous avons subdivisé les périodes intermenstruelles en leurs phases prolifératrices et sécrétrices, afin de comparer les valeurs mesurées au moment de ces phases avec celles obtenues lors des menstruations.

Voici comment nous avons procédé. Chez chaque patiente, nous avons tout d'abord calculé pour chaque cycle la moyenne des résultats des mesures effectuées pendant la période de menstruation et celle des résultats des mesures effectuées pendant la période intermenstruelle. La différence de ces deux moyennes donnait donc pour chaque cycle l'augmentation (ou la diminution) du paramètre étudié entre la menstruation et la période intermenstruelle. La somme des augmentations (ou diminutions) chez les 5 patientes a permis de calculer leur valeur moyenne (M) ainsi que l'erreur standard de cette moyenne, soit $\frac{s}{\sqrt{N}}$, où s représente la déviation standard de la moyenne et N le nombre d'augmentations (ou de diminutions). Puis nous avons déterminé les limites de confiance (ou limites fiduciaires) supérieures (L_s) et inférieures (L_i) de la moyenne M , par les formules : $L_s = M + t_s/\sqrt{N}$ et $L_i = M - t_s/\sqrt{N}$ dans lesquelles t est la valeur prise dans la distribution de "student", pour un degré de liberté de $N-1$ et une probabilité fixée à 5 %. Dès que la limite de confiance L_i était positive, cela signifiait que la moyenne des augmentations (ou diminutions) s'écartait de façon significative de 0 et que l'augmentation (ou la diminution) du paramètre à l'étude était significative.

Tous les résultats concernant soit les analyses cellulaires, soit les analyses enzymatiques, seront présentés sous forme de graphiques, donnant la moyenne de l'augmentation (ou de la diminution) du paramètre étudié en fonction des phases du cycle menstruel, ainsi que les limites de confiance supérieures et inférieures. L'axe des ordonnées indiquera la valeur du paramètre mesurée dans les produits de ringage et l'axe des abscisses les phases du cycle menstruel (menstruation et période intermenstruelle). En outre chez la patiente no 1, que nous avons suivie pendant la période la plus longue (12 cycles menstruels successifs), la période intermenstruelle a été subdivisée en ses phases prolifératrice et sécrétrice afin de détailler l'évolution des paramètres pendant cette période.

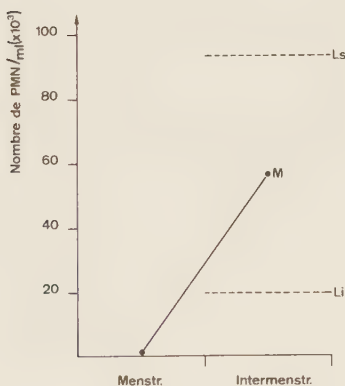
3.2. Résultats des comptages de cellules

3.2.1. Leucocytes polymorphonucléaires

Sur le graphique no 1 le nombre de leucocytes polymorphonucléaires (PMN) est représenté en ordonnée en fonction des phases du cycle menstruel, en abscisse. Les limites de confiance Li et Ls, ainsi que la moyenne M des variations (dans ce cas une augmentation) sont aussi indiquées.

Comme on peut le voir sur le graphique, le nombre de leucocytes PMN par millilitre de produit de rinçage a augmenté de façon significative au moment de la période intermenstruelle. Cette augmentation a été, en moyenne, de 56.500 PMN/ml chez les 5 patientes (M sur le graphique no 1).

Graph. 1 : Variation du nombre de leucocytes PMN
chez les 5 patientes



Représentation graphique de l'augmentation moyenne (M) du nombre de leucocytes polymorphonucléaires dans les produits de rinçage gingival. L'axe des ordonnées indique le nombre de PMN par ml de produit de rinçage et l'axe des abscisses indique les deux phases principales du cycle menstruel, c'est-à-dire la menstruation (Menstr.) et la période intermenstruelle (intermenstr.).

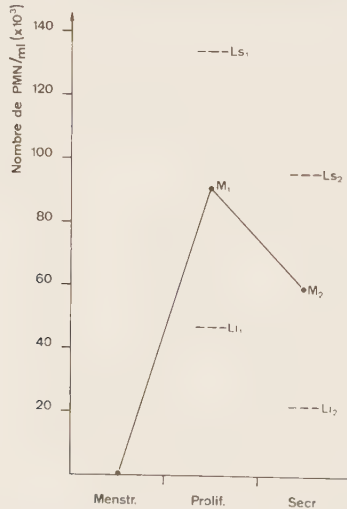
La limite de confiance supérieure est représentée par la ligne pointillée Ls alors que la limite de confiance inférieure est représentée par la ligne Li.

L'augmentation moyenne est statistiquement significative ($Li > 0$)

Dans le but de détailler l'évolution de cette augmentation, nous avons représenté sur le graphique no 2, les variations du nombre de leucocytes PMN chez la patiente no 1 que nous avons suivie pendant la période la plus longue (12 cycles menstruels successifs). Une augmentation moyenne de 90.000 PMN/ml (représentée par M_1 sur le graphique no 2) a été observée entre la menstruation et la phase prolifératrice. Cette augmentation est significative, comme le témoigne une limite de confiance inférieure (Li_1) plus grande que 0. Une seconde augmentation a pu être observée entre la menstruation et la phase sécrétrice. La moyenne de cette augmentation s'élevait à 59.000 PMN/ml (M_2 sur le graphique no 2) et était également significative, comme le montre une limite de confiance inférieure (Li_2) positive.

Il est intéressant de relever que chez cette patiente le nombre de leucocytes PMN était en moyenne de 46.900 PMN/ml au moment des menstruations, de 128.800 PMN/ml lors des phases prolifératrices, et de 108.000 PMN/ml lors des phases sécrétrices.

Graph. 2 : Variations du nombre de leucocytes PMN chez la patiente n° 1



Augmentations du nombre de leucocytes PMN chez la patiente n° 1. L'axe des ordonnées indique le nombre de PMN par ml de produit de rinçage; l'axe des abscisses indique les phases du cycle menstruel. Dans ce graphique, la période intermenstruelle a été subdivisée en phase prolifératrice (prolif.) et sécrétrice (secr.). On peut observer une première augmentation statistiquement significative au moment de la phase prolifératrice (M_1) puis une seconde également significative, au moment de la phase sécrétrice (M_2).

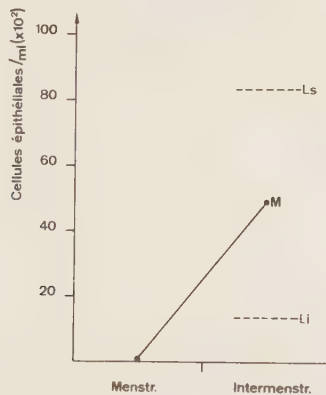
L'étude concernant les PMN dans les produits de rinçages gingivaux nous a donc permis de constater que le nombre de ces cellules subissait, chez les 5 patientes, des variations cycliques, avec un maximum lors des phases prolifératrices et un minimum pendant la menstruation. Ces variations semblent ainsi suivre celles de la concentration des hormones sexuelles femelles circulantes.

3.2.2. Cellules épithéliales

La variation du nombre de cellules épithéliales pendant le cycle menstruel, toujours chez les 5 patientes, apparaît dans le graphique no 3. L'axe des ordonnées indique le nombre de cellules épithéliales par ml de produit de rinçage et l'axe des abscisses les phases du cycle.

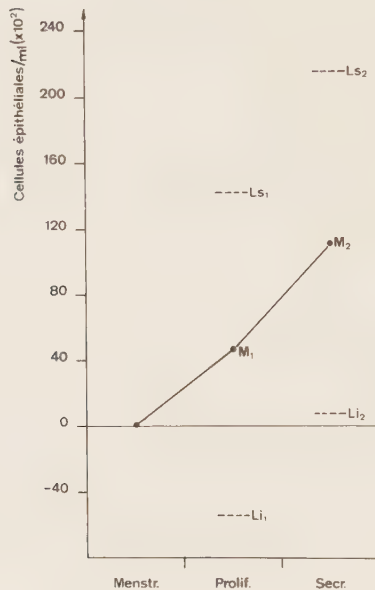
Nous avons trouvé, pour les cellules épithéliales, le même type de variation que pour les leucocytes PMN : pendant la période intermenstruelle, le nombre de ces cellules a présenté une augmentation significative ($Li > 0$). L'augmentation moyenne atteignait 4900 cellules/ml (M sur le graphique no 3). Pour la patiente no 1, dont les résultats sont représentés sur le graphique no 4, on a observé une première augmentation, non significative ($Li < 0$) qui s'élevait à 4500 cellules/ml pendant la phase prolifératrice (M_1 sur le graphique no 4) puis une deuxième augmentation, significative celle-ci ($Li_2 > 0$) qui atteignait 11.000 cellules/ml lors de la phase sécrétrice (M_2 sur le graphique no 4).

Graph. 3 : Variation du nombre de cellules épithéliales chez les 5 patientes



Représentation graphique de l'augmentation moyenne du nombre de cellules épithéliales chez les 5 patientes. L'axe des ordonnées indique le nombre de cellules épithéliales par ml de produit de rinçage et l'axe des abscisses les phases du cycle menstruel. L'augmentation moyenne du nombre de cellules épithéliales lors de la période intermenstruelle (M) est significative ($Li > 0$).

Graph. 4 : Variation du nombre de cellules épithéliales
chez la patiente no 1



Détail des variations du nombre de cellules épithéliales chez la patiente no 1. La première augmentation (M₁) lors de la phase prolifératrice est non significative, alors que la seconde augmentation (M₂) lors de la phase sécrétrice, est significative.

Ainsi on a pu constater que les cellules épithéliales suivaient les mêmes variations cycliques que les leucocytes PMN et tendaient également à atteindre leur valeur maximale pendant la période intermenstruelle.

3.3. Analyses enzymatiques

En fonction des phases du cycle menstruel, les activités libres, totales et intracellulaires spécifiques de la cathepsine D, de la protéase neutre et de la β -glucuronidase ont été déterminées. Rappelons que l'activité libre exprime la concentration extralyso-somiale de l'enzyme alors que l'activité totale est celle que l'on obtient après destruction des parois lysosomiales. Quant à l'activité intracellulaire spécifique, elle a été appréciée en divisant la différence entre l'activité totale et libre de l'enzyme par le nombre de leucocytes PMN comptés dans le même volume de produit de rinçage.

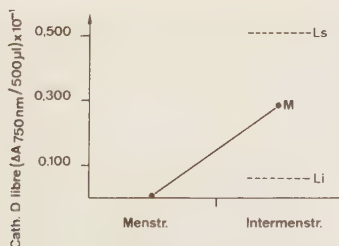
3.3.1. Cathepsine D

3.3.1.1. Cathepsine D libre

Le graphique no 5 montre l'évolution de l'activité de la cathepsine D libre chez les 5 patientes, en rapport avec les phases du cycle menstruel. L'axe des ordonnées indique l'activité de la cathepsine D exprimée par l'absorbance mesurée lors de l'analyse dans 500 μ l de produit de rinçage (ΔA 750 nm/500 μ l). Pendant les périodes intermenstruelles, nous avons pu constater une augmentation significative ($Li > 0$) de l'activité de la cathepsine D libre. La moyenne de cette augmentation était de 0,0290 (ΔA 750/500 μ l : M sur le graphique no 5).

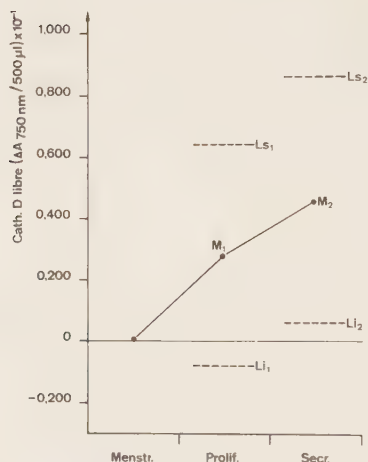
Dans le graphique no 6, nous avons détaillé cette évolution lors des phases prolifératrices et sécrétrices chez la patiente no 1. On a ainsi pu observer qu'une première augmentation non significative avait lieu au moment de la phase prolifératrice, puis une seconde augmentation significative ($Li_2 > 0$) a été observée au moment de la phase sécrétrice. Ainsi il s'est avéré que, tout comme le nombre de cellules, l'activité de la cathepsine D libre subissait des variations cycliques avec un minimum au moment des menstruations et des valeurs maximales pendant les phases intermenstruelles.

Graph. 5 : Variation de la cathepsine D libre chez les 5 patientes



Variation de l'activité de la cathepsine D libre (extracellulaire) chez les 5 patientes. L'axe des ordonnées montre l'activité libre de l'enzyme mesurée dans 500 μ l de produit de rinçage. L'axe des abscisses indique les phases du cycle menstruel. L'augmentation de la cathepsine D libre au moment de la période intermenstruelle (M) est significative.

Graph. 6 : Variation de l'activité de la cathepsine D libre
chez la patiente no 1

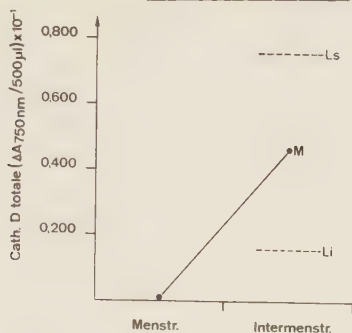


Variation de l'activité de la cathepsine D libre chez la patiente no 1. La première augmentation de l'activité enzymatique (M_1) est non significative ($Li < 0$) alors que la seconde augmentation (M_2) est statistiquement significative.

3.3.1.2. Cathepsine D totale

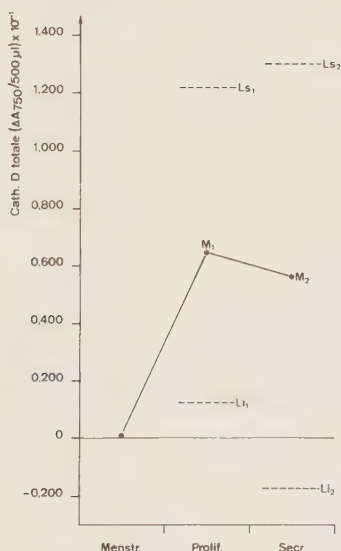
L'activité de la cathepsine D totale a également été examinée en fonction des phases du cycle menstruel. Le graphique no 7 montre les variations obtenues chez les 5 patientes et le graphique no 8 chez la patiente no 1. Les variations que nous avons constatées pour la cathepsine D totale sont semblables à celles de la cathepsine D libre : une augmentation significative a pu être mesurée au moment de la période intermenstruelle, chez les 5 patientes. En outre, la patiente no 1 montrait une première augmentation significative lors de la phase prolifératrice (M_1) puis une seconde augmentation au moment de la phase sécrétrice (M_2).

Graph. 7 : Variation de l'activité de la cathepsine D totale chez les 5 patientes



Augmentation significative de l'activité totale de la cathepsine D chez les 5 patientes lors de la période intermenstruelle. L'axe des ordonnées indique l'activité de la cathepsine D et l'axe des abscisses les phases du cycle menstruel.

Graph. 8 : Variation de l'activité de la cathepsine D totale chez la patiente no 1



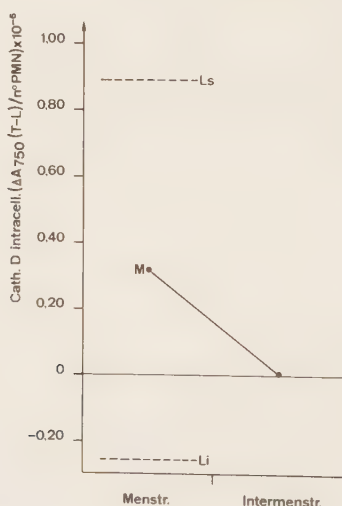
Variation de l'activité totale de la cathepsine D chez la patiente no 1. La première augmentation au moment de la phase prolifératrice (M_1) est statistiquement significative, alors que la deuxième augmentation, lors de la phase sécrétrice (M_2), n'est plus significative.

3.3.1.3. Cathepsine D intracellulaire spécifique

Après avoir divisé la différence entre les activités de la cathepsine D totale et libre par le nombre de leucocytes PMN, dans 1 ml de produit de rinçage, on a obtenu une estimation de l'activité intracellulaire spécifique de cette enzyme. Comme le montre le graphique no 9, l'activité intracellulaire spécifique de la cathepsine D était maximale au moment des menstruations, puis diminuait pendant les périodes intermenstruelles. Pour la patiente no 1, les détails de ces variations sont indiqués sur le graphique no 10 : on a pu constater une première diminution significative de la cathepsine D intracellulaire lors des phases prolifératrices (M_1 sur le graphique no 10) puis une deuxième diminution également significative, lors des phases sécrétrices (M_2).

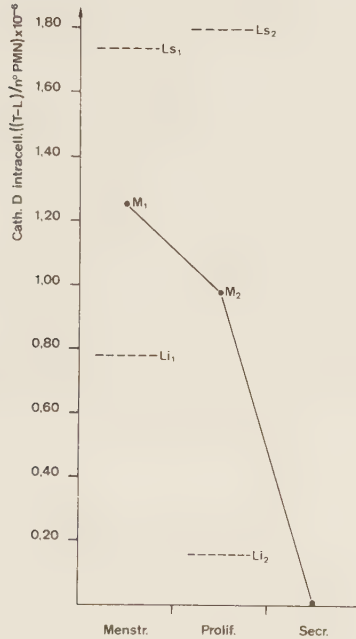
Il faut donc souligner que la cathepsine D intracellulaire spécifique montrait son activité maximale au moment des menstruations, précisément lorsque son activité libre (extracellulaire) était minimale (graphiques nos 5 et 6).

Graph. 9 : Variation de l'activité de la cathepsine D intracellulaire spécifique chez les 5 patientes



Représentation graphique de la diminution de l'activité intracellulaire spécifique de la cathepsine D au moment de la période intermenstruelle, chez les 5 patientes. L'axe des ordonnées indique l'activité intracellulaire spécifique de l'enzyme, calculée en divisant la différence entre l'activité totale (T) et libre (L) par le nombre de leucocytes PMN. L'axe des abscisses indique les phases du cycle menstruel. Cette diminution n'est pas statistiquement significative ($Li < 0$).

Graph. 10 : Variation de l'activité de la cathepsine D intracellulaire spécifique chez la patiente no 1



Détails des variations de l'activité intracellulaire spécifique de la cathepsine D. Une première diminution statistiquement significative a été observée au moment de la phase prolifératrice (M_1) puis une seconde diminution, également significative a été observée au moment de la phase sécrétrice (M_2).

3.3.2. Protéase neutre

Les activités libres, totales et intracellulaires spécifiques de la protéase neutre ont été mesurées chez deux patientes, en fonction des phases du cycle menstruel. Pour cette enzyme, les mêmes variations que pour la cathepsine D ont été observées : l'activité de la protéase neutre totale montrait en effet une augmentation significative pendant la période intermenstruelle.

Quant à l'activité libre de cette même enzyme, il est important de relever qu'elle n'a pu être décelée qu'en très petites quantités dans la plupart des produits de rinçage. Cependant, cette concentration tendait aussi à augmenter au moment de la période intermenstruelle.

Concernant l'évolution de l'activité intracellulaire spécifique de la protéase neutre durant les cycles menstruels, nous avons fait les mêmes observations que pour la cathepsine D. Ainsi, l'activité intracellulaire spécifique de la protéase neutre était maximale au moment des menstruations et diminuait significativement pendant les périodes intermenstruelles, suggérant à nouveau un relâchement extracellulaire d'enzyme.

3.3.3. β -glucuronidase

De même que pour les enzymes étudiées précédemment, les activités de la β -glucuronidase libre, totale et intracellulaire ont été déterminées chez les 5 patientes pendant les différentes phases des cycles menstruels.

L'activité de la β -glucuronidase libre montrait un accroissement non significatif lors de la période intermenstruelle. Par contre, cet accroissement était plus important et significatif chez la patiente no 1.

La β -glucuronidase totale suivait la même évolution que la β -glucuronidase libre, avec une augmentation significative de son activité lors des périodes intermenstruelles.

L'activité intracellulaire spécifique a été estimée de la même manière que pour les enzymes étudiées précédemment. Comme on pouvait s'y attendre, l'activité intracellulaire spécifique de la β -glucuronidase subissait les mêmes variations que celles de la cathepsine D et de la protéase neutre, avec une valeur maximale au moment des menstruations, tendant à diminuer lors des périodes intermenstruelles.

4. Discussion

=====

La fréquence et la sévérité des gingivites augmentent chez la femme lorsqu'elle est sous l'influence des hormones sexuelles femelles, par exemple pendant la grossesse (42,56). Cette aggravation ne peut s'expliquer uniquement par une augmentation éventuelle de la quantité de plaque bactérienne au niveau des dents (28).

Il semble que le parodonte puisse être considéré comme un tissu cible pour les hormones sexuelles femelles : dans ces conditions, l'accentuation de la réponse inflammatoire à l'irritation bactérienne pourrait être consécutive aux modifications tissulaires provoquées par ces hormones. Formicola (23) a observé, chez des rats ovariectomisés, que le tissu gingival accumulait très rapidement le 17β oestradiol, qui est un dérivé de l'oestrone et qui possède une action hyperémique sur les tissus. Plus récemment, les recherches in vitro de El Attar ont montré que la gencive, surtout lorsqu'elle est enflammée, possède un système enzymatique spécifique capable de convertir l'Oestrone précisément en 17β -Oestradiol et la progestérone en 5α et 5β Pregnagnedione (20,21,22).

Dans le présent travail, nous avons étudié les effets possibles des variations des hormones sexuelles femelles sur certains paramètres cellulaires et enzymatiques du sillon gingivo-dentaire chez un groupe de femmes prenant des contraceptifs hormonaux et présentant une bonne hygiène bucco-dentaire. La méthode de collection que nous avons choisie permet d'obtenir le produit de rinçage de la région gingivale marginale de l'arcade supérieure lorsque la gencive est cliniquement saine. En outre, cette technique permet des rinçages répétés lors d'une étude longitudinale et offre l'avantage de ne pas irriter mécaniquement le sillon gingivo-dentaire.

Les cellules épithéliales récoltées dans nos rinçages sont des cellules desquamées et leur nombre dépend de la vitesse de renouvellement des épithéliums jonctionnel et crévulaire (55). Chez l'animal, il a été démontré que les hormones oestrogènes et leurs dérivés agissent sur la vitesse de renouvellement de l'épithélium en augmentant le nombre des mitoses et la vitesse de la division mitotique (5,12,49). Nos résultats chez l'homme confirment ces observations et montrent précisément que le nombre de cellules épithéliales semble augmenter de façon significative dans les lavements effectués pendant les phases prolifératrices et sécrétrices des cycles.

Le sillon gingivo-dentaire est la porte d'entrée principale des leucocytes PMN dans la cavité buccale (54). Ces cellules migrent continuellement vers le sillon à partir des capillaires et à travers l'épithélium jonctionnel (13), cette migration étant modu-

lée par des facteurs chémotactiques libérés par la plaque bactérienne (4,27). A ce sujet, il est important de rappeler que des variations du nombre de ces cellules dans la salive ont été observées par Schiött et Løe à différents moments de la journée (54) : pour cette raison les rinçages ont toujours été effectués le matin.

Les résultats des comptages montrent que le nombre de leucocytes PMN était minimum pendant les menstruations et augmentait durant les phases prolifératrices et sécrétrices. Ces variations cycliques ne sauraient provenir de changements dans la quantité de plaque puisque nos patientes présentaient toutes des gencives saines. Elles pourraient, d'une part, être le reflet des variations du nombre de PMN dans le sang, telles qu'elles ont été décrites chez des femmes prenant des contraceptifs hormonaux : Bain et England (8) ont en effet remarqué une augmentation du nombre des PMN sanguins en présence de taux élevés d'hormones, probablement due à un relâchement accentué de ces cellules à partir de la moelle osseuse. D'autre part, le groupe de Lindhe (38,39) a montré chez le hamster un accroissement de la perméabilité des capillaires gingivaux sous l'action d'hormones progestagènes.

Les leucocytes PMN ont principalement un rôle défensif en phagocytant les micro-organismes et en les "digérant" sous l'action de leurs enzymes lysosomiales. Cependant, ces enzymes peuvent être libérées dans le milieu extracellulaire lors de réactions inflammatoires et (ou) immunologiques (3,62) entre autre au moment de la phagocytose et contribuer à la dégradation tissulaire. Lors d'une gingivite expérimentale chez l'homme, une augmentation des concentrations de cathepsine D et de β -glucuronidase en fonction du degré d'inflammation a d'ailleurs été démontrée dans les produits de lavements de gencive (6).

Les analyses enzymatiques de notre recherche montrent que les 3 enzymes étudiées suivaient les mêmes variations cycliques que les cellules PMN avec un minimum d'activité au moment des menstruations, ces variations étant particulièrement évidentes pour la cathepsine D. Au sujet de la protéase neutre, il est intéressant de rappeler que si la concentration totale de cette enzyme était importante, sa concentration libre, c'est-à-dire extracellulaire, était pratiquement nulle durant toute la durée du cycle, à l'exception parfois de la période intermenstruelle. Il est possible que l'activité libre de cette enzyme soit diminuée par des inhibiteurs tels que les α_2 macroglobulines, comme c'est le cas dans le serum (50,51). Bien qu'une origine bactérienne des trois enzymes ne puisse pas être exclue, il est très probable que l'accroissement de l'activité enzymatique pendant les phases prolifératrice et sécrétrice soit due à l'augmentation du nombre des leucocytes PMN. A ce sujet, il faut rappeler que l'hygiène de nos patientes était excellente pendant toute la période d'étude. Par ailleurs, une étude préliminaire utilisant une méthode d'électrophorèse sur gel n'a pas permis de mettre en

évidence d'isoenzymes bactériennes de la β -glucuronidase dans les produits de rinçage prélevés à partir de gencives saines (14). Ainsi les concentrations enzymatiques mesurées dans notre étude reflètent vraisemblablement les activités lysosomiales (mammaliennes) de ces enzymes.

L'index obtenu en divisant la différence entre les activités totales et libres des enzymes par le nombre des leucocytes PMN donne une estimation de l'activité intracellulaire spécifique de ces enzymes. Cette activité intracellulaire tendait à augmenter pendant les menstruations pour les trois enzymes étudiées, précisément au moment où l'activité libre de ces mêmes enzymes montrait une tendance à diminuer : ces résultats supportent donc l'hypothèse d'une libération extracellulaire d'enzymes lysosomiales durant les phases prolifératrice et sécrétrice des cycles par labilisation probable des membranes lysosomiales sous l'action des hormones sexuelles femelles.

Il semble donc que l'augmentation de l'activité enzymatique libre rencontrée au niveau du sillon gingivo dentaire sous l'action de taux élevé d'hormones sexuelles femelles puisse être expliquée d'une part par l'augmentation du nombre de cellules et, d'autre part par une action de fragilisation des membranes des lysosomes dans ces mêmes cellules. Cette augmentation de l'activité d'enzymes hydrolytiques pourrait sensibiliser le "terrain gingival" et contribuer à l'aggravation d'une maladie parodontale lorsque la plaque bactérienne a pu s'accumuler au niveau marginal.

5. Conclusions

=====

- 5.1. Chez un groupe de femmes présentant une gencive saine et prenant des contraceptifs hormonaux, le nombre de PMN au niveau du sillon gingivo-dentaire montrait les mêmes variations cycliques que les taux des hormones sexuelles circulantes. Ainsi on a observé une augmentation statistiquement significative du nombre de ces cellules dans les produits de rinçage gingival lors de la période intermenstruelle du cycle avec un minimum au moment de la menstruation.
- 5.2. Le nombre des cellules épithéliales desquamées au niveau de ce même sillon montrait les mêmes variations cycliques : il augmentait significativement pendant la période intermenstruelle et tendait à diminuer au moment des règles.
- 5.3. Les activités libres (extralysosomiales) et totales de la cathepsine D, de la protéase neutre (elastase) et de la β -glucuronidase dans les produits de rinçage du sillon gingivo-dentaire montraient également une augmentation significative lors des périodes intermenstruelles, cette augmentation étant particulièrement prononcée pour la cathepsine D.
- 5.4. Les activités intracellulaires spécifiques de ces mêmes enzymes montraient par contre une diminution au moment des périodes intermenstruelles et augmentaient au moment des règles.
- 5.5. L'augmentation de la concentration d'enzymes lysosomiales en fonction du taux accru d'hormones sexuelles pourrait expliquer la vulnérabilité particulière du terrain gingival sous l'action de ces hormones.

Bibliographie

=====

1. ALLISON, A. Lysosomes and disease.
Sci. Amer. 217 : 62-72 (1967)
2. ANSON, M.L. The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with hemoglobin.
J. Gen. Physiol. 22 : 79-89 (1938)
3. ARRIGONI-MARTELLI, E., and RESTELLI, A.
Release of lysosomal enzymes in experimental inflammations : effects of antiinflammatory drugs.
Europ. J. Pharmac. 19 : 191-198 (1972)
4. ATTSTROM, R. The roles of gingival epithelium and phagocytosing leucocytes in gingival defence.
J. Clin. Periodontol. 2 : 25-32 (1975)
5. BACHNIK, F.L., PATRICK, D.T., GARGIULO, A.W.
Cell removal time and movement in the ovariectomized mouse interdental epithelium.
Periodontics 5 : 172-174 (1967)
6. BAEHNI, P. Enzymes lysosomiales dans les produits de rinçage de la région parodontale marginale au cours de la gingivite expérimentale chez l'homme.
Médecine et Hygiène. Thèse 315 (1974)
7. BAGGIOLINI, M. The enzymes of the granules of polymorphonuclear leucocytes and their functions.
Enzyme 13 : 132-160 (1972)
8. BAIN, B.J. and ENGLAND, J.M. Variations in leucocyte count during menstrual cycle.
Brit. Med. J. 2 : 472-475 (1975)
9. BARRETT, A.J. in : Lysosomes in biology and pathology.
Vol. 2 : 288-292 (J.T. Dingle Editor)
North-Holland Publishing Co - Amst - London (1969)
10. BARRETT, A.J. Lysosomal enzymes. In Dingle Lysosomes, a laboratory handbook
Chapter 2. p.46. North-Holland, Amsterdam (1972)

11. BRIGGS, M.H. and BRIGGS, M. Serum activity of lysosomal enzymes in relationship to contraceptive steroid dose.
Cur. Med. Res. opin. 3 : 203-205 (1975)
12. BULLOUGH, H.F. The mitogenic actions of starch and oestrone on the epidermis of the adult mouse.
J. of Endocrin. 6 : 350-355 (1950)
13. CIMASONI, G. The crevicular fluid. Monographs in Oral Science.
Vol. 3 (H.W. Myers, editor) Karger Press, Bâle (1974)
14. CIMASONI, G., ISHIKAWA, I. and JACCARD, F. Enzyme activity in the gingival crevice. In : The borderline between caries and periodontal diseases.
Ed. T. Lehner, Academic Press, Londres (sous presse)
15. COCHRANE, P. and WEATHERALL, P.J. The variation of neutrophil alkaline phosphatase during the menstrual cycle.
J. of obstet. Gynaec. of the British Commonwealth
Vol. 79 : 101-102 (1972)
16. DINGLE, J.T. Electron microscopy of the vacuolar apparatus.
In : Lysosomes.
p. 153-199 (Dingle J.T., editor) North-Holland Publishing Co. Amsterdam - London (1972)
17. DINGLE, J.T. Protein catabolism. In : Lysosomes in biol. and pathol.
p. 228-233 (Dingle, J.T. editor) North-Holland Publishing Co - Amsterdam-London (1973)
18. DOWALD, B., RINDLER-LUDWIG, R., BIETZ, U. and BAGGIOLINI, M. Subcellular localisation and heterogeneity of neutral proteases in neutrophilic polymorphonuclear leucocytes.
J. Exp. Med. 141, 709-723 (1975)
19. EL-ASHIRY, G.M., EL-KAFRAWY, A-H., NASR, M.F. and YOUNIS, N. Effects of oral contraceptives on the gingiva.
J. Periodont. 42 : 273-275 (1971)
20. EL ATTAR, T.M.A. and HUGOSON, A. Steroid, oestrone, in normal and inflamed human gingiva.
Archs. oral. Biol. vol. 19 : 425-429 (1974)

21. EL ATTAR, T.M.A., HUGOSON, A. Comparative metabolism of female sex steroids in normal and chronically inflamed gingiva of the dog.
J. Periodont. Res. 9 : 284-289 (1974)
22. EL ATTAR, T.M.A., ROTH G.D., HUGOSON, A. Comparative metabolism of H¹⁴ C.progesterone in normal and chronically inflamed human gingival tissue.
J. Periodont. Res. 8 : 79-83 (1973)
23. FORMICOLA, A.J., WEATHERFORD, T., GRUPE, H. The uptake of H³ oestradiol by the oral tissues of rats.
J. Periodont. Res. 5 : 269-275 (1970)
24. GOGGINS, J.F. and BILLUPS, L.C. Cytochemical measurements of β -glucuronidase activity in normal and inflamed human gingiva.
J. Histochem. Cytochem. 19 : 416-420 (1971)
25. HARTLEY, B.S. Proteolytic enzymes.
Ann. Rev. Biochemic. 29 : 45-72 (1960)
26. HECHTER, P., KROHN, L. and HARRIS, J. The effect of oestrogen on the permeability of the uterine capillaries.
Endocrinology 29 : 386-392 (1941)
27. HELLDEN, L., LINDHE, J. Enhanced emigration of crevicular leucocytes mediated by factors in human dental plaque.
Scand. J. dent. Res. 81 : 123 (1973)
28. HUGOSON A. Gingival inflammation and female sex hormones.
J. Periodont. Res. Suppl. 5 (1970)
29. ISHIKAWA, I., CIMASONI, G. and AHMAD-ZADEH, C. Possible role of lysosomal enzymes in the pathogenesis of periodontitis : A study on cathepsin D in human gingival fluid.
Arch. Oral Biol. 17 : 111-117 (1972)
30. ISHIKAWA, I., and CIMASONI, G. Degradation of immunoglobulin G by the neutral protease from human polymorphonuclear leucocytes.
Arch. oral. Biol. (In print)

31. KEILOVA, H. On the specificity and inhibition of cathepsins D and B. In : Tissue proteinases.
Chapter 3 : 45-56 (Barrett, A.J. and Dingle, J.T. editors), North-Holland Publishing Co (1971)
32. KULLANDER, A. and NILSSON, I.M. Gestanger och Koagulation,
Lakartidningen 63 : 4831-4891 (1966)
33. LABHART, A. Clinical endocrinology : theory and practice.
Chapter X : 511, Springer-Verlag - Berlin- Heidelberg - New-York (1974)
34. LINDHE, J., ATTSTROM, R. and BJORN, A.L. Influence of sex hormones in gingiva exudation in gingivitis - free female dogs.
J. Periodont. Res. 3 : 273-278 (1968)
35. LINDHE, J., ATTSTROM, R. and BJORN, A.L. Influence of sex hormones on gingival exudation in dogs with chronic gingivitis.
J. Periodont. Res. 3 : 279-283 (1968)
36. LINDHE, J., ATTSTROM, R. and BJORN, A.L. The influence of progesterone on gingival exudation during menstrual cycles.
J. Periodont. Res. 4 : 97-102 (1969)
37. LINDHE, J. and BJORN, A.L. Influence of hormonal contraceptives on the gingiva of women.
J. Periodont. Res. 2: 1-6, 1967
38. LINDHE, J. and BRANEMARK, P.I. Changes in microcirculation after local application of sex hormones.
J. Periodont. Res. 2 : 185-193 (1967)
39. LINDHE, J. and BRANEMARK, P.I. Changes in vascular permeability after local application of sex hormones.
J. Periodont. Res. 2 : 259-265 (1967)
40. LINDHE, J., BRANEMARK, P.I., LUNDSKEG, J. Changes in vascular proliferation after local application of sex hormones.
J. Periodont. Res. 2 : 266-272 (1967)
41. LINDHE, J. and BRANEMARK, P.I. The effects of sex hormones on vascularisation of granulation tissue.
J. Periodont. Res. 3 : 6-11 (1968)

42. LOE, H. and SILNESS, J. Periodontal disease in pregnancy : I prevalence and severity.
Acta Odont. Scand. 21 : 533-551 (1963)
43. LOE, H. Periodontal changes in pregnancy.
J. Periodont. 36 : 209-217 (1965)
44. MARTIN, E. and SPAHR, J. Le laboratoire du praticien.
2e edition, Siegfried Société Anonyme Zofingue/Suisse
45. MEAD, J.A.R., SMITH, J.N. and WILLIAMS, R.T. Studies in detoxication - 67 : The biosynthesis of the glucuronides of umbelliferone and 4-methylumbelliferone and their use in fluorometric determination of β -glucuronidase.
Biochem. J. 61 : 569-574 (1967)
46. MOHAMED, A.H., WATERHOUSE, J.P. and FRIEDERICH, H.R. The microvasculature of the rabbit gingiva as affected by Progesterone : An ultrastructural study.
J. Periodontol. 45 : 50-59 (1974)
47. NOZAWA, S., KURIHARA, S., TSUTSUI, F. and WATANABE, K. The effects of oestrogens on the lysosomes of rat vaginal epithelium ; A histochemical study.
Acta Endocr. (KBH) 77 : 193-208 (1974)
48. NEUBERGER, A. and TATUM, E.L. Frontiers in biology. Lysosomes in biology and pathology.
1rst ed., p. 209, North-Holland, Amsterdam (1969)
49. NUTLAY, A.G., BASKAR, S.N., WEINMANN, J.P. and BUDY, A.M. The effect of Oestrogen in the supporting structures of molars in rats and mice.
J. Dent. Res. 32 : 674 (1952)
50. OHLSSON, K., OLSSON, J. and TYNELIUS-BRATTHALL, G. Neutrophil leucocyte collagenase, elastase and serum protease inhibitors in human gingival crevices.
Acta Odont. scand. 31 : 51-59 (1973)

51. OHLSSON, K. Neutral leucocytes proteases and elastase inhibited by plasma α_1 -antitripsin.
Scand. J. Clin. Lab. Invest. 28 : 251-253 (1971)
52. OPPENHEIM, F.G. Preliminary observations on the presence and origin of serum albumin in human saliva.
Helv. Odont. Acta 14 : 10-17 (1970)
53. PERSELLIN, R.H., KU, L.C. Effects of steroid hormones on human polymorphonuclear leucocytes lysosomes.
J. Clin. Invest. 54 : 919-925 (1974)
54. SCHIÖTT, C.R. and LOE, H. The origin and variation in number of leucocytes in the human saliva.
J. Periodont. Res. 5 : 36-41 (1970)
55. SCHROEDER, H.E. Orale Strukturbilogie.
Georg Thieme Verlag Stuttgart, Ch. 3 : 252-255 (1976)
56. SILNESS, J. and LOE, H. Periodontal disease in pregnancy.
II. - Correlation between oral hygiene and periodontal condition.
Acta Odont. Scand. 22 : 121-135 (1964)
57. SUDAN, J.M. Produits de rinçage de la région parodontale marginale : étude biochimique.
Thèse n° 316, Médecine et Hygiène, Genève (1974)
58. SZEGO, M.C. The lysosomal membrane complex, focal point of primary steroid hormone action.
Biochemistry 123 : 523-538 (1971)
59. TZAMOURANIS, A., MATTHYS, J., ISHIKAWA, I. and CIMASONI, G. Increase of extracellular cathepsin D activity in gingival washings during experimental gingivitis in man.
Arch. Oral Biol. 22 : 375-378 (1977)
60. WATTIAUX, R. and de DUVE, C. Tissue fractionation studies. Release of bound hydrolases by means of Triton X 100.
Biochem. Journal 63 : 606 (1956)

61. WEISSMANN, C. The role of lysosomes in inflammation and disease.
Ann. Rev. Med. 18 : 97-112 (1967)
62. WEISSMANN, G., ZURIER, R.B. and HOFFSTEIN, S. Leukocytic proteases
and the immunologic release of lysosomal enzymes.
Amer. J. Pathol. 68 : 539-559 (1972)
63. WOESSNER, J.F. Jr. Cathepsin D : enzymic properties and role in
connective tissue breakdown. In : Barrett and
Dingle Tissue Proteinases.
Chap. 13 : 291, North-Holland Pub. Co. Amsterdam
(1971)

